

Use of an imaging photoelectric flat sensor for evaluating biochips and imaging method therefor

Patent number: DE10036457

Publication date: 2002-02-14

Inventor: GRILL HANS-JOERG (DE); LECLERC NORBERT (DE); SCHUETZ ANDREAS (DE); PRIX LOTHAR (DE)

Applicant: GIESING MICHAEL (DE)

Classification:

- **international:** G01N33/48; G01N21/76; C12Q1/00; G01N21/64

- **european:** C12Q1/68B10A; G01N21/64P; G01N21/76B; G01N33/543B; G01N33/543K

Application number: DE20001036457 20000726

Priority number(s): DE20001036457 20000726

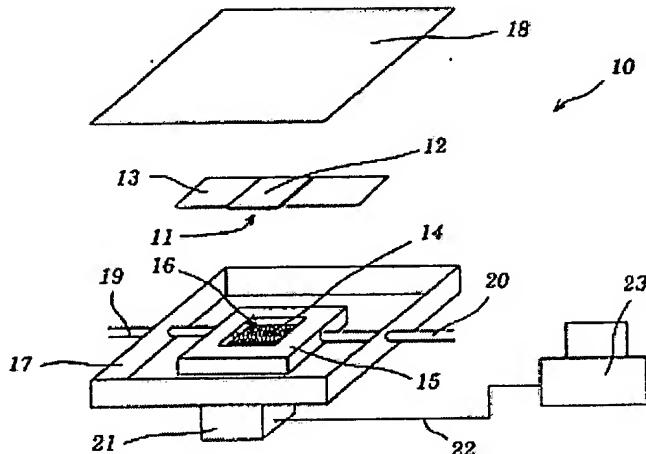
Also published as:

WO0208458 (A1)
US2003157581 (A1)
EP1309729 (B1)

[Report a data error here](#)

Abstract of DE10036457

The invention relates to the use of an imaging photoelectric flat sensor (14), e.g. a CC sensor, for contact imaging of the surface (11) of a biochip (13) by measuring radiation such as chemical luminescent, biological luminescent or fluorescent radiation emitted from the surface of the biochip. The invention also relates to an imaging method therefor. The biochip (13) is arranged at the smallest possible distance from a flat sensor (14). A local resolution, two-dimensional image of the radiation emitted from the surface of the functionalized area (12) can be detected by the flat sensor (14) without the need for an intermediate optical imaging system.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 100 36 457 A 1

⑯ Int. Cl.⁷:
G 01 N 33/48
G 01 N 21/76
C 12 Q 1/00
G 01 N 21/64

⑯ Aktenzeichen: 100 36 457.8
⑯ Anmeldetag: 26. 7. 2000
⑯ Offenlegungstag: 14. 2. 2002

DE 100 36 457 A 1

⑯ Anmelder:

Giesing, Michael, Prof. Dr.med., 45659
Recklinghausen, DE

⑯ Vertreter:

Reitstötter, Kinzebach & Partner, 81679 München

⑯ Erfinder:

Grill, Hans-Jörg, Dr., 45659 Recklinghausen, DE;
Leclerc, Norbert, Dr., 07743 Jena, DE; Schütz,
Andreas, Dr., 45739 Oer-Erkenschwick, DE; Prix,
Lothar, Dr., 45663 Recklinghausen, DE

⑯ Entgegenhaltungen:

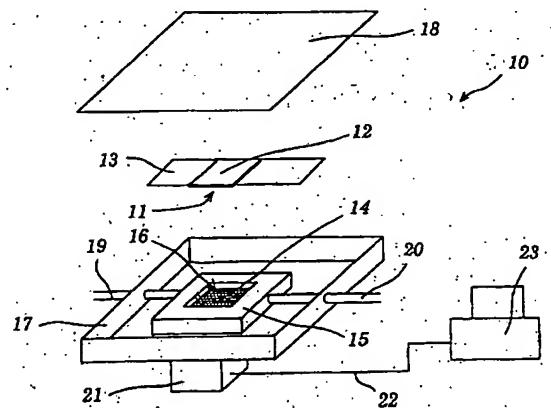
| | |
|----|---------------|
| DE | 199 40 749 A1 |
| DE | 197 36 641 A1 |
| US | 55 45 531 |
| US | 55 08 200 |
| WO | 97 35 181 A1 |

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Verwendung eines bildgebenden photoelektrischen Flächensensors zur Auswertung von Biochips und Bildgebungsverfahren hierfür

⑯ Die Erfindung betrifft die Verwendung eines bildgebenden photoelektrischen Flächensensors 14, beispielsweise eines CCD-Sensors, zur Kontaktabbildung der Oberfläche 11 eines Biochips 13 durch Messung einer von der Oberfläche des Biochips emittierten Strahlung, wie etwa Chemi-, Biolumineszenz- oder Fluoreszenzstrahlung, und ein Bildgebungsverfahren hierfür. Dazu wird der Biochip 13 in möglichst geringem Abstand von einem Flächensensor 14 angeordnet. Der Flächensensor 14 kann dann ohne Zwischenleitung eines abbildenden optischen Systems ein ortsaufgelöstes zweidimensionales Abbild der von der Oberfläche des funktionalisierten Bereichs 12 emittierten Strahlung detektieren.



DE 100 36 457 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft die Verwendung eines bildgebenden photoelektrischen Flächensensors zur Auswertung von Biochips und ein Bildgebungsverfahren hierfür. Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur ortsaufgelösten Detektion von elektromagnetischer Strahlung, die von auf einer Oberfläche eines planaren Trägers immobilisierten Substanzen emittiert wird, mittels eines bildgebenden photoelektrischen Flächensensors.

[0002] Das Erkennen bestimmter genetischer Informationen ist eine elementare molekularbiologische Aufgabenstellung, zu deren Lösung bereits eine große Zahl unterschiedlichster Methoden vorgeschlagen wurde. Kann eine gesuchte genetische Information auf bestimmte Nukleinsäuresequenzen (im folgenden als Targetsequenzen oder Targets bezeichnet) zurückgeführt werden, benutzt man in vielen Fällen sogenannte Oligonukleotidsonden, deren Nukleinsäuresequenzen zu den Targetsequenzen komplementär sind. Aufgrund ihrer Komplementarität können die Oligonukleotidsonden und die Targetsequenzen spezifisch hybridisieren, so daß man die gesuchten Targetsequenzen in einem Pool umfangreicher und komplexer genetischer Informationen identifizieren und qualitativ und/oder quantitativ analysieren kann.

[0003] Klassische Anwendungen dieser Art sind Northern- und Southern-Blots, sowie die in-situ Hybridisierung. Dazu werden die Proben in der Regel zweckgerecht vorbereitet und mit Hilfe definierter Oligonukleotidsonden untersucht. Bei herkömmlichen Anwendungen dieser Art sind üblicherweise die Oligonukleotidsonden markiert und können so, abhängig von der gewählten Markierung, detektiert werden. Dies ist erforderlich, um probengebundene Sonden, d. h. Sonden, die spezifisch an Targetsequenzen hybridisiert haben, erkennen zu können.

[0004] Zur Markierung der Sonden werden Substanzen, sog. Marker, eingesetzt, die mit Hilfe geeigneter Nachweismethoden identifiziert werden können. Weit verbreitet sind insbesondere radioaktive Marker, sowie Chemilumineszenz- oder Fluoreszenzmarker.

[0005] Dabei haben insbesondere Fluoreszenz- und Chemilumineszenzmethoden in der chemischen und biologischen Analytik und Diagnostik einen hohen Stellenwert. Es handelt sich um sehr nachweisstarke Methoden, die ohne Radioaktivität und, falls erforderlich, ohne toxische Substanzen auskommen. Viele der verwendeten Marker sind verglichen mit Radioisotopen bei entsprechender Lagerung praktisch unbegrenzt haltbar. Es existieren heute empfindliche optische Detektionssysteme, die schon den Nachweis einzelner Markermoleküle ermöglichen. Außerdem existiert eine Vielfalt unterschiedlichster Fluoreszenzfarbstoffe, so daß für die meisten Wellenlängenbereiche im sichtbaren Spektrum, aber auch im angrenzenden ultravioletten und infraroten Spektralbereich auf geeignete Fluoreszenzmarker zurückgegriffen werden kann. Entsprechend sind geeignete Chemilumineszenzsubstrate für viele Enzyme, beispielsweise Peroxidasen, Alkalische Phosphatase, Glucose-Oxidase und andere verfügbar. Leistungsfähige Chemilumineszenzsubstrate mit einer Signalstabilität von über einer Stunde sind kommerziell erhältlich.

[0006] Bei den oben erwähnten klassischen Hybridisierungsmethoden ist die Zahl der unterschiedlichen Sonden, die in Verbindung mit ein und derselben Probe eingesetzt werden können, begrenzt. Um die Sonden unterscheiden zu können, sind unterschiedliche, d. h. nicht interferierende Markierungen und in der Folge auch unterschiedliche Detektionssysteme erforderlich. Der damit verbundene Aufwand stößt spätestens bei Multi-Parameter-Analysen an die

Grenzen der Praktikabilität.

[0007] Entscheidende Vorteile bieten in dieser Hinsicht Testanordnungen mit immobilisierten Oligonukleotidsonden, d. h. Sonden, die an einen festen Träger fixiert sind. Um bei derartigen Systemen eine Bindung von Probe und Sonde erkennen zu können, wird in diesen Fällen die Probe und nicht die Sonde markiert. Unter einem festen Träger versteht man dabei ein Material mit starrer oder halbstarrer Oberfläche. Bei derartigen Trägern kann es sich beispielsweise um 5 Partikel, Stränge, insbesondere Faserbündel, sphärische Körper, wie Kugeln oder Kugelchen (sogenannte "beads"), Fällungsprodukte, Gele, Blätter, Röhren, Behältnisse, Kapillarröhrchen, Scheiben, Folien oder Platten handeln. Am weitesten verbreitet sind inzwischen jedoch planare, d. h. ebene Träger.

[0008] Soll eine Probe mittels mehrerer Sonden mit unterschiedlicher Spezifität untersucht werden, so werden diese Sonden üblicherweise auf einem gemeinsamen Träger so angeordnet, daß jede Sondenart, also beispielsweise eine bestimmte Oligonukleotidsonde mit bekannter Sequenz, einem bestimmten Feld eines zweidimensionalen Feldmusters (allgemein als "Array" bezeichnet) auf dem Träger zugeordnet wird. Die Feststellung, ob und/oder gegebenenfalls in welchem Maße die markierte Probe an ein bestimmtes Feld bindet, erlaubt Rückschlüsse auf die zur Sonde dieses Feldes komplementäre Targetsequenz der Probe und gegebenenfalls auf deren Konzentration.

[0009] Durch fortschreitende Miniaturisierung konnten die Felder mittlerweile wesentlich verkleinert werden, so daß man heute eine Vielzahl verfahrens- und meßtechnisch unterschiedbare Felder, also auch eine Vielzahl unterschiedbarer Sonden auf einem einzelnen Träger anordnen kann. Obwohl Glasträger im molekularbiologischen Bereich für diese Zwecke noch am weitesten verbreitet sind, werden die planaren Träger in Anlehnung an die Halbleitertechnologie auch als "Chips", insbesondere als Biochips, Genchips usw. bezeichnet. Die Sonden können in sehr hoher Dichte an den Träger gebunden und mehrere Sonden einer Sondenart in einem miniaturisierten Feld angeordnet werden. Heute können bereits Chips mit bis zu 40.000 unterschiedlichen molekularen Sonden pro cm^2 hergestellt werden.

[0010] Vor allem hat die Anwendung photolithographischer Fabrikationstechniken aus der Halbleitertechnologie zu entscheidenden Fortschritten bei der Herstellung solcher Chips geführt. Das Prinzip basiert auf einer lichtgesteuerten chemischen Festphasensynthese, bei der photolithographische Masken die Felder abbilden (vgl. beispielsweise Fodor et al. "Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis", Science, Vol. 251, 767-773 (1991)). Dieses Verfahren ist insbesondere dann von Vorteil, wenn die Sonden auf dem Träger in-situ aus einzelnen Bausteinen, beispielsweise Nukleotiden, aufgebaut werden sollen. So kann ein bestimmter Baustein gezielt an die im Aufbau befindlichen Sonden bestimmter Felder angefügt werden, während die Sonden der übrigen Felder unberührt bleiben. Dies gelingt mit photolithographischen Masken, die Licht zur lichtgesteuerten chemischen Synthese nur auf diejenigen Felder abbilden, an die der Baustein angefügt werden soll. Beispielsweise kann der Lichteinfall die Abspaltung lichtempfindlicher Schutzgruppen bewirken, wodurch eine reaktive Gruppe genau an derjenigen Stelle der im Aufbau befindlichen Sonden freigesetzt wird, an die der Baustein angefügt werden soll. Da ein zuletzt angefügter Baustein in der Regel eine gebundene Schutzgruppe einbringt und dadurch die um einen Baustein erweiterten Sonden wieder schützt, wird an eine aktivierte Sonde lediglich ein einziger Baustein angefügt. Aus dem gleichen Grund stehen die während eines Zyklus um einen Baustein erweiterten Sonden gleichermaßen

wie die in diesem Zyklus nicht erweiterten Sonden als zunächst geschützte Gesamtheit aller Sonden einer neuen gezielten Aktivierung durch eine passende Maske für die Anfügung eines weiteren Baustein in einem neuen Zyklus zur Verfügung. Derartige Verfahren werden ausführlich in den internationalen Patentanmeldungen WO 90/15070, WO 91/07087, WO 92/10092, WO 92/10587, WO 92/10588 und in dem US-Patent 5,143,854 beschrieben.

[0011] Andere Chips weisen wiederum Sonden auf, die nicht in-situ synthetisiert, sondern in vorgefertigter Form auf den Träger aufgebracht werden. Entsprechende Arrays aus Biomolekülen zur Sequenzanalyse von Polynukleotiden wurden bereits von E. Southern in der internationalen Patentanmeldung WO 89/10977 beschrieben. Biomolekulare Arrays eignen sich für eine Vielzahl von Anwendungen, angefangen von der Sequenzierung von DNA über das DNA-Fingerprinting bis zu Anwendungen in der medizinischen Diagnostik. Inzwischen werden schon kommerzielle Biochips mit einer Vielzahl verschiedener cDNAs zur Hybridisierung angeboten. Bei diesen cDNAs handelt es sich beispielsweise um Nukleinsäuresequenzen mit Längen von etwa 200 bis 600 Basenpaaren (bp), die mittels genspezifischer Primer amplifiziert werden, deren Identität durch Teilsequenzierung überprüft wird und die dann gezielt an bekannten Plätzen beispielsweise auf einer Nylonmembran angebracht werden.

[0012] Werden die markierten Proben mit dem planaren Chip in Kontakt gebracht, so kann es auf einzelnen Feldern zu einer Kopplung, beispielsweise einer Hybridisierung, mit komplementären Sonden kommen. In Fällen, in denen eine Markierung der Proben nicht zweckmäßig ist, kann auch nach Bindung der Proben an die Sonden der Chip mit geeigneten markierten Rezeptoren, die spezifisch an die Proben binden, in Kontakt gebracht werden. In beiden Fällen werden Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzmarker auf denjenigen Feldelementen immobilisiert, wo eine Bindung zwischen Sonden und Proben stattgefunden hat. Bei fluoreszenzoptischen Nachweismethoden wird der Chip dann mit Licht einer geeigneten Wellenlänge bestrahlt, so daß die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden und Fluoreszenzstrahlung emittieren. Bei einer Nachweismethode durch Lumineszenz wird kein externes Anregungslicht benötigt. Vielmehr verwendet man chemilumineszierenden oder biolumineszierenden Systeme als Marker zur Signalerzeugung. Die Fluoreszenz- oder Lumineszenzstrahlung erzeugt ein Muster aus hellen und dunklen Feldelementen auf dem planaren Träger, das aufgezeichnet wird. Informationen über die Probe kann man also dadurch erhalten, daß man das Hell/Dunkel-Muster mit dem bekannten Muster der an die Trägeroberfläche fixierten biologischen Sonden vergleicht.

[0013] Die fortschreitende Miniaturisierung hat zu einer großen Anzahl von Feldelementen auf einem einzelnen planaren Träger geführt, die bei kommerziellen Anwendungen in kurzer Zeit sehr zuverlässig vermessen werden müssen. Zum ortsaufgelösten fluoreszenzoptischen Nachweis von auf einem Biochip immobilisierten Substanzen werden heute hauptsächlich sogenannte Scanne eingesetzt, bei denen die Oberfläche des Chips mit einem fokussierten Laserstrahl abgetastet und das emittierte Fluoreszenzlicht detektiert wird. Ein entsprechender Fluoreszenzscanner wird von der Firma Hewlett-Packard für die Auswertung von Biochips der Firma Affymetrix hergestellt und ist in den US-Patenten 5,837,475 und 5,945,679 detaillierter beschrieben. Es sind auch Scanner bekannt, bei denen ein konfokales Anregungs- und Detektionssystem in ein Epifluoreszenzmikroskop integriert ist. Als Detektionssysteme für das emittierte Fluoreszenzlicht werden bei Scannern meist sogenannte

Einkanalsysteme, also beispielsweise einzelne Photozellen oder Sekundärelektronenvervielfacher (Photomultiplier) verwendet.

[0014] Es sind jedoch auch zweidimensionale Detektionssysteme, wie beispielsweise CCD-Kameras bekannt, die sowohl zur Detektion von Fluoreszenzlicht als auch zur Detektion von Chemilumineszenzlicht einer Probe verwendet werden können. Kommerziell erhältliche Systeme besitzen entweder ein optisches Abbildungssystem, welches unter Verwendung von Linsenoptiken die mit Chemilumineszenzmarkern oder Fluoreszenzmarkern versehene Biochipoberfläche auf einen CCD-Sensor abbilden, oder eine Kombination aus einem Bildverstärker (Image Intensifier) und einer CCD-Kamera.

[0015] Die bekannten Fluoreszenz- oder Lumineszenzdetektionssysteme für Biochips weisen jedoch Nachteile auf. So sind CCD-Kameras mit einer Linsenoptik meist recht teuer, da entweder aufwendig korrigierte asphärische Objektive verwendet werden oder bei Einsatz einer weniger aufwendigen Abbildungsoptik eine Korrektur der Bildverzerrung und Vignettierung durch eine komplexe Bildbearbeitungssoftware erforderlich ist. Für eine ausreichend hohe Empfindlichkeit ist es außerdem meist notwendig, mit gekühlten CCD-Sensoren oder sogenannten "Slow-Scan, Full-Frame Scientific Chips" zu arbeiten. Auch die Verwendung von Bildverstärkern ist neben den hohen Kosten mit weiteren Nachteilen verbunden. So ist zum Betrieb eines Bildverstärkers ein Hochspannungsanschluß an der Abbildungsoptik erforderlich, was beim Arbeiten mit wässrigen Medien, wie beispielsweise Puffern, Gefahren für den Benutzer mit sich bringt. Soweit Faseroptiken verwendet werden, treten Verluste beim Ein- und Auskoppeln des Fluoreszenz- oder Lumineszenzlichtes in die Fasern auf. Außerdem ist die Auflösung von faseroptischen Abbildungssystemen begrenzt.

[0016] Der vorliegenden Erfindung liegt daher das technische Problem zugrunde, ein einfaches und kostengünstiges Bildgebungssystem zur ortsaufgelösten Detektion von elektromagnetischer Strahlung, insbesondere Lumineszenz- und/oder Fluoreszenzstrahlung, die von auf einer planaren Oberfläche eines Trägers, insbesondere eines Biochips, immobilisierten Substanzen emittiert wird, anzugeben.

[0017] Zur Lösung dieses Problems schlägt die Erfindung vor, einen bildgebenden photoelektrischen Flächensensor zur Kontaktabbildung einer Oberfläche eines Biochips zu verwenden. Überraschenderweise wurde gefunden, daß es möglich ist, die Fluoreszenz- oder Lumineszenzstrahlung, die von auf einer im wesentlichen planaren Oberfläche eines Biochips immobilisierten Substanzen emittiert wird, ortsaufgelöst und mit hoher Empfindlichkeit zu detektieren, indem man einen bildgebenden photoelektrischen Flächensensor in möglichst geringem Abstand von der Oberfläche des Biochips anordnet, die immobilisierten Substanzen zur Emission von elektromagnetischer Strahlung, vorzugsweise von Licht im sichtbaren und/oder infraroten und/oder ultravioletten Spektralbereich anregt, und die emittierte Strahlung ohne Verwendung eines abbildenden optischen Systems photoelektrisch detektiert.

[0018] Unter dem Begriff "Anregung" ist hier nicht nur eine Anregung durch Einstrahlung von elektromagnetischer Strahlung zu verstehen, wie dies beispielsweise zur Fluoreszenzdetektion erforderlich ist. Vielmehr soll der Begriff "Anregung" jegliche Beeinflussung der immobilisierten Substanzen umfassen, die mit der anschließenden Emission von Licht verbunden ist, insbesondere auf der Basis von Chemi- oder Biolumineszenz. Wenn hier von "immobilisierten Substanzen" die Rede ist, so bedeutet dies nicht, daß die entsprechenden Substanzen völlig unbeweglich sind. Viel-

mehr soll damit ausgedrückt werden, daß die Beweglichkeit der Sonden innerhalb eines Inkubations- und/oder Meßintervalls, also im Sekunden- oder Minutenbereich, so gering ist, daß noch eine eindeutige räumliche Zuordnung der Substanz zu einem Feldelement des Biochips möglich ist.
 [0019] Mit der Erfindung sind zahlreiche Vorteile verbunden:

Das erfundungsgemäße Detektionssystem ist besonders kostengünstig, da es ohne Linsenoptiken, Bildverstärker oder Faseroptiken zur Abbildung des Biochips auf dem Flächensensor auskommt. Herkömmliche, mit Optiken arbeitende Systeme müssen hohe Signalverluste durch die Optik in Kauf nehmen. Außerdem kommt durch den kleineren Raumwinkel der optischen Abbildungssysteme über eine größere Distanz nur ein Bruchteil des Ausgangssignals am Detektor an. Diese Verluste müssen bei den bekannten Detektoren durch teure Hochleistungsdetektoren oder elektronische Bildverstärker ausgeglichen werden. Dagegen ist es bei der vorliegenden Erfindung durch einen Verzicht auf jegliche Abbildungsoptik und durch die unmittelbare räumliche Nähe von Signalerzeugung und Detektion möglich, emittiertes Licht aus einem großen Raumwinkelbereich zu empfangen. Daher kann auf einfache und kostengünstige Detektoren zurückgegriffen werden kann. Die hohe Signalausbeute ermöglicht außerdem sehr kurze Meßzeiten – in manchen Fällen genügt eine Meßzeit von weniger als 50 ms für einen kompletten Biochip.

[0020] Das Detektionssystem ist gegenüber dem Stand der Technik kompakter, hochgradig miniaturisiert und einfach zu bedienen, da keine Fokussierung oder Justierung vorgenommen werden muß. Durch Verzicht auf ein optisches Abbildungssystem können auch keine Bildverfälschungen, wie Vignettierung, Verzerrung oder Änderung der Dynamik auftreten. Aufgrund seiner Kompaktheit und seiner Miniaturisierung ist das erfundungsgemäße Detektionssystem leicht in automatische Analysensysteme integrierbar.

[0021] Bei ähnlicher Empfindlichkeit ist die Bedienung wesentlich einfacher und schneller als bei einem Röntgenfilm. Außerdem erhält man direkt digitalisierte Daten, die weiterverarbeitet werden können.

[0022] Als Flächensensor werden bevorzugt ein Dioden- oder Transistorarray, ein CCD-Sensor (etwa ein Video-, Full Frame- oder Zeilensensor, ein Slow-Scan Scientific CCD oder auch ein Line-Transfer-Model) oder ein TFA-Bildsensor verwendet. TFA steht dabei für "Thin Film on ASIC (Application Specific Integrated Circuit)". TFA-Bildsenso- ren bestehen beispielsweise aus einer dünnen Schicht aus amorphem Silizium auf einem ASIC-Sensor. Auch Zeilenarrays sollen in diesem Zusammenhang unter den Begriff "Flächensensor" fallen, da beispielsweise lineare Zeilenarrays aufgrund ihrer endlichen Querabmessungen stets eine bestimmte Fläche des Biochips bedecken.

[0023] Das Detektionssystem besteht demnach gemäß einer bevorzugten Ausführungsform aus einem bildgebenden Flächensensor und einem Biochip, der für die Messung direkt auf die Sensorfläche gelegt wird. Zwischen Flächensensor und Biochip kann ein Abstandhalter angeordnet sein, der beispielsweise einen Reaktionsraum definiert, der im Fall einer Chemi- oder Biolumineszenznachweismethode mit Lumineszenzsystemkomponenten, in der Regel an der Lumineszenzreaktion beteiligten Reaktanden, z. B. Chemilumineszenzsubstrat, oder, falls das Substrat auf der Chipoberfläche fixiert ist, mit Enzymlösung gefüllt werden kann. Durch Aktivierung des Substrats wird Chemilumineszenz- oder Biolumineszenzstrahlung emittiert und vom Flächensensor ortsaufgelöst photoelektrisch detektiert.

[0024] Typischerweise werden Flächensensoren mit mehr als 10 000 Pixeln verwendet. Die Sensorfläche ist vorzugs-

weise wenigstens so groß wird die abzubildende Oberfläche des Biochips und beträgt üblicherweise 40 bis 100 mm². Da sämtliche Pixel des Flächensensors gleichzeitig belichtet werden, sind schnelle Messungen zeitgleich über eine große Fläche hinweg möglich. Der Flächensensor ist bevorzugt im wesentlichen parallel zur Oberfläche des Biochips orientiert, kann aber ansonsten weitgehend beliebig im Detektionssystem angeordnet sein, beispielsweise horizontal, vertikal oder in einer "upside down"-Orientierung.

[0025] Der direkte Kontakt bzw. der sehr geringe Abstand zwischen Flächensensor und Oberfläche des Biochips entspricht einer Art Kontaktbelichtung, wie sie von Filmen oder Photoplaten her bekannt ist, ohne allerdings deren spezifischen Nachteile in Kauf nehmen zu müssen: So ist herkömmlicherweise für jedes Bild ein neuer Film oder eine neue Photoplatte notwendig, die anschließend aufwendig entwickelt und fixiert werden müssen. Bevor die mit herkömmlichen Filmen oder Photoplatten aufgenommenen Bilder rechnerisch bearbeitet oder ausgewertet werden können, müssen sie nach der Entwicklung noch digitalisiert werden. Im Gegensatz dazu lassen sich die von dem bildgebenden photoelektrischen Flächensensor gelieferten Signale während der Belichtung digitalisieren und rechnerisch bearbeiten. Die Signalintegrationszeit ist variabel und kann je nach Art des verwendeten Bildsensors bzw. der Stärke des Chemilumineszenzsignals gewählt und gegebenenfalls sogar erst während der laufenden Messung endgültig festgelegt werden. Außerdem kann der Flächensensor oder das gesamte Detektionssystem, in das er integriert, ist nach einer Messung gewaschen, getrocknet und erneut benutzt werden.

[0026] Wenn man einen Bildsensor, beispielsweise ein Video-CCD-Sensor mit niedrigem dynamischen Bereich verwendet, kann der Meßbereich durch geeignete Steuertools durch automatische Variation der Belichtungszeit auf mindestens 10 Bit ausgeweitet werden. Scientific-CCDs sind sogar mit einem Meßbereich von 12 bis 18 Bit erhältlich. Bei Verwendung von sogenannten "locally adaptive TFA-Sensoren" ist es sogar möglich, die von herkömmlicher CMOS- bzw. CCD-Technologien her bekannte dynamische Bandbreite von 70 dB durch Trennen der Pixelinformation in zwei separate Signale auf eine dynamische Bandbreite von 150 dB oder mehr zu erhöhen.

[0027] Das bei der Kontaktabbildung der Oberfläche eines Biochips erzielbare räumliche Auflösungsvermögen wird einerseits durch die Pixelgröße des Flächensensors und andererseits durch den Abstand des Biochips vom Flächensensor bestimmt. Sofern zwischen Flächensensor und Biochip ein Reaktionsraum zur Durchführung von Chemi- oder Biolumineszenzreaktionen vorgesehen ist, wird ein räumliches Auflösungsvermögen von 20 µm oder besser angestrebt. In Fällen, in denen ein direkter Kontakt von Flächensensor und Biochip realisiert werden kann, entspricht das Auflösungsvermögen der Pixelgröße des Sensors selbst.

[0028] Als Biochip können alle Formate gewählt werden, die über eine planare Oberfläche verfügen oder bei denen die aktiven Substanzen nicht in Vertiefungen immobilisiert sind, die tiefer sind als die gewünschte räumliche Auflösung. Die Biochips weisen an einer planaren Trägeroberfläche immobilisierte Substanzen auf, wobei diese immobilisierten Substanzen an der Oberfläche fixierte biologische Sonden und/oder an die Sonden gebundene Proben sein können. Dabei können die Sonden, die Proben, die Sonden und die Proben oder gegebenenfalls weitere an die Sonden oder die Proben bindende Substratmoleküle markiert sein.

[0029] Als Trägermaterial können folgende Stoffe verwendet werden: Glas (Standardglas, Pyrexglas, Quarzglas), Kunststoffe bevorzugt hoher Reinheit bzw. geringer Eigenfluoreszenz (wie Polyolefine, z. B. PE (Polyethylen), PP

(Polypropylen), Polymethylpenten, Polystyrol, PMMA (Poly(methylmethacrylat)), Polycarbonat, Teflon), Metalle (wie Gold, Chrom, Kupfer, Titan, Silizium), oxidische Materialien bzw. Beschichtungen (Keramiken, aluminiumdotiertes Zinkoxid (TCO), Silica, Aluminiumoxid). Die Trägermaterialien können als Membranen (wie Polysacharide, Polycarbonat, Nafion), dreidimensionale Strukturen (etwa Gele z. B. Polyacrylamid, Agarose, Keramiken) oder auch Formteile aus obigen Materialien, wie Folien und Dipsicks, ausgebildet sein. Für eine bessere Haftung, die Reduzierung unspezifischer Bindung oder für eine kovalente Ankopplung der Sonden kann das Aufbringen einer Zwischenschicht oder eine Voraktivierung der Oberfläche notwendig sein, z. B. durch Silane (Alkylsilane, Epoxy silane, Aminosilane, Carboxysilane), Polymere (Polysaccharide, Polyethylenglycol, Polystyrol, polyfluorierte Kohlenwasserstoffe, Polyolefine, Polypeptide), Alkylthiole, derivatisierte Alkylthiole, Lipide, Lipid-Doppelschichten oder Langmuir-Blodget Membranen.

[0030] Die Aufbringung der Sonden auf die Oberfläche erfolgt durch Pipettieren, Dispensieren, Drucken, Stempeln oder *in situ* Synthese (wie z. B. photolithographische Techniken). Es werden bevorzugt verschiedene Sonden in einem zweidimensionalen Muster auf die Oberfläche aufgebracht. Jeder Sonde kann dann eine eindeutige Position auf der Oberfläche zugeordnet werden. Die Ankopplung der Sonden kann kovalent, adsorptiv oder über physikalisch/chemische Wechselwirkungen der Sonden mit der Oberfläche erfolgen. Es können alle bekannten Techniken eingesetzt werden.

[0031] Mit Sonden sind Strukturen gemeint, die mit einem oder mehreren Targets (Proben) in spezifische Wechselwirkung treten können. So dienen Biochip-Sonden in der Regel zur Untersuchung biologischer Targets, insbesondere Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und Metabolite. Als Sonden werden bevorzugt verwendet: Nukleinsäuren und Oligonukleotide (einzel- und/oder doppelsträngige DNA, RNA, PNA, LNA in Reinform oder auch in Kombinationen), Antikörper (humane, tierische, polyklonale, monoklonale, rekombinante, Antikörperfragmente, z. B. Fab, Fab', F(ab)₂, synthetische), Proteine (etwa Allergene, Inhibitoren, Rezeptoren), Enzyme (etwa Peroxidasen, Alkalische-Phosphatasen, Glukose-Oxidase, Nukleasen), kleine Moleküle (Haptene): Pestizide, Hormone, Antibiotika, Pharmaka, Farbstoffe, synthetische Rezeptoren oder Rezeptorliganden. Besonders bevorzugt handelt es sich bei den Sonden um Nukleinsäuren, insbesondere Oligonukleotide.

[0032] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist außerdem ein Verfahren zur ortsaufgelösten Detektion von elektromagnetischer Strahlung, insbesondere von Chemilumineszenz-, Biolumineszenz- und Fluoreszenzstrahlung, die auf einer planaren Oberfläche eines Trägers immobilisierten Substanzen emittiert wird, wobei man einen bildgenden photoelektrischen Flächensensor in geringem Abstand von der Oberfläche des Trägers anordnet, die immobilisierten Substanzen zur Emission von elektromagnetischer Strahlung anregt und die emittierte Strahlung ohne Verwendung eines abbildenden optischen Systems photoelektrisch detektiert.

[0033] Bevorzugt detektiert man eine von den immobilisierten Substanzen emittierte Chemilumineszenz- und Biolumineszenzstrahlung. In diesem Fall ist keine Einstrahlung von Anregungslicht erforderlich, so daß das erfundungsgeräte Detektionssystem besonders kostengünstig realisiert werden kann. Die Detektion von Lumineszenzstrahlung hat außerdem den Vorteil, daß die Strahlung direkt von der Oberfläche des planaren Trägers stammt und keine störende Streustrahlung aus dem den Träger bedeckenden Reaktions-

raum oder dem Träger selbst ausgestrahlt wird.

[0034] Bei Chemi- oder Biolumineszenzmessungen kann das System so ausgelegt sein, daß schon die Bindung der Probe an die Sonde zur Lichtemission führt. In diesen Fällen werden die für die Lumineszenzreaktion erforderlichen Systemkomponenten durch Bildung eines Sonden/Proben-Komplexes bereitgestellt. Es ist auch möglich, daß erst nach der Bindung von Sonde und Probe in einem weiteren Schritt noch erforderliche Komponenten, z. B. ein geeignetes Chemilumineszenzsubstrat, zugegeben werden, die durch – nunmehr selbst an die fixierten Sonden gebundene – Proben zu lichtemittierenden Produkten umgesetzt werden. Vorzugsweise erzeugt man die Chemilumineszenzstrahlung auf der Oberfläche des planaren Trägers durch enzymatische Reaktionen. Dazu wird entweder ein Chemilumineszenzsubstrat oder ein Enzymkomplex auf dem Träger fixiert und eine Lösung des Enzyms bzw. eines Chemilumineszenzsubstrates zugegeben. Beim Umsatz des Substrates wird Licht emittiert. Jedenfalls werden die nachzuweisenden auf dem Biochip immobilisierten Substanzen üblicherweise mit einem Lumineszenzmarker versehen. Dies kann direkt erfolgen (Verwendung von Enzymen z. B. Meerrettichperoxidase (POD) oder Enzymsubstraten (z. B. Luminol)) oder über einen mehrstufigen Prozeß (Einführung eines primären Labels wie Biotin oder Digoxigenin (DIG) und Nachinkubation mit Lumineszenzmarkern wie POD-markiertem Streptavidin oder anti-DIG). Der letzte Schritt ist üblicherweise die Zugabe von Enzymsubstratlösung oder, wenn Substratmoleküle wie Luminol als Marker verwendet wurden, von Enzymlösung. Die Verwendung von Enzymen als Marker hat den Vorteil, daß durch die Enzymreaktion eine enorme Signalamplifikation erreicht wird. Alle chemilumineszierenden oder biolumineszierenden Systeme sind als Marker zur Signalerazeugung bei der Biochipauswertung denkbar, z. B. Alkalische Phosphatase mit Dioxetan-(AMPPD) oder Acridiniumphosphat-Substraten; Meerrettichperoxidase mit Luminol- oder Acridiniumester-Substraten; Mikroperoxidasen oder Metallporphyrinsysteme mit Luminol; Glucoseoxidase, Glucose-6-phosphatehydrogenase; oder auch Luciferin/Luciferase-Systeme.

[0035] Gemäß einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird von den immobilisierten Substanzen emittierte Fluoreszenzstrahlung detektiert. Gegenüber den enzymatischen Chemilumineszenzsystemen haben Fluoreszenzfarbstoffe den Vorteil, daß die Messung direkt nach Einführung des Markers erfolgen kann. Enzym- oder Proteinmarker (beispielsweise der häufig eingesetzte Biotin/Streptavidin-Komplex) benötigen dagegen einen weiteren Inkubationsschritt, in welchem der Enzymmarker eingeführt und die Substratlösung zugegeben wird. Allerdings ist für Fluoreszenzmessungen die Einstrahlung von Anregungslicht notwendig. Da der Flächensor und die Oberfläche des Biochips nur in einem geringen Abstand voneinander angeordnet sind, wird vorzugsweise ein Träger verwendet, in den beispielsweise von der dem Träger abgewandten Rückseite her Anregungslicht eingekoppelt werden kann. Das eingekoppelte Anregungslicht wird dann unter Totalreflexion in dem Träger geführt, wobei die Anregung der auf der Oberfläche des Trägers immobilisierten Substanzen durch evanescentes Licht erfolgt. Hierbei ist selbstverständlich auf ein möglichst fluoreszenzarmes Trägermaterial zu achten. Zur Unterdrückung von Streulichtanteilen in dem vom Flächensensor detektierten Signal können Sensoren mit schneller Ansprechzeit verwendet werden. Bei Anregung mit kurzen Lichtimpulsen kann dann der Streulichtanteil durch zeitliche Diskriminierung vom eigentlich interessierenden, zeitlich verzögerten Fluoreszenzsignal unterschieden werden.

[0036] Es ist erfundungsgemäß schließlich auch möglich,

die zu untersuchenden Substanzen direkt auf dem photoelektrischen Flächensensor zu immobilisieren. In diesem Fall dient der Flächensensor gleichzeitig als Träger für die Substanzen. Der Träger kann dann beispielsweise eine dünne Quarzsicht sein, die direkt auf den photoelektrischen Zellen des Flächensensors als Schutzschicht vorgesehen ist. Die Oberfläche des Flächensensors kann dazu auch geeignet beschichtet sein (z. B. kann eine hydrophobe Oberfläche durch Silanisierung erzeugt werden).

[0037] Der Flächensensor kann in eine Durchflusszelle integriert werden. Es können zusätzliche Einrichtungen zur Substratzugabe, zum Waschen oder zum Trocknen vorgesehen sein.

[0038] Die vorliegende Erfindung kann beispielsweise zur Auswertung von nichtkompetitiven oder kompetitiven Testverfahren genutzt werden. Bei nichtkompetitiven bindet die zu analysierende Probe an die auf der Oberfläche des Biochips vorab immobilisierte Sonde. Die Probe kann man zuvor mit einem Chemilumineszenzmarker versehen. Es ist auch möglich, daß die Probe zuerst an die fixierte Sonde bindet und in einem zweiten Schritt markiert wird (z. B. bei Primer Extension oder Rolling Cycle PCR). In all diesen Fällen erhält man ein Meßsignal, das um so größer ist, je mehr gebundene Probenmoleküle vorhanden ist. Es ist auch möglich, daß durch die Wechselwirkung der Probe mit den auf der Oberfläche immobilisierten Sonden die Aktivität des die Chemilumineszenz katalysierenden Enzyms verändert wird (Abschwächung, Verstärkung, z. B. Enzymhemmtests) und diese Änderung als Meßsignal registriert wird. Als Beispiele für nichtkompetitive Testverfahren können Hybridisierungsreaktionen von PCR-Produkten oder markierter DNA/RNA an auf der Oberfläche immobilisierte Oligonukleotide oder cDNA oder Sandwichimmunoassays genannt werden. Bei kompetitiven Testverfahren wird der Probe eine markierte Substanz zugesetzt, die ähnliche Bindungseigenschaften zu den auf der Oberfläche immobilisierten Sonde hat wie die Probe selbst. Es findet eine Konkurrenzreaktion zwischen Probe und Marker um die begrenzte Anzahl von Bindungsplätzen auf der Oberfläche statt. Man erhält ein Signal, das um so niedriger ist, je mehr Probenmoleküle vorhanden ist. Beispiele hierfür sind Immunoassays (ELISA) oder Rezeptorassays.

[0039] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden unter Bezugnahme auf in den beigefügten Zeichnungen dargestellte Ausführungsbeispiele ausführlicher beschrieben.

[0040] In den Zeichnungen zeigt:

[0041] Fig. 1 eine schematische Explosionsdarstellung einer Vorrichtung zur Kontaktabbildung der von einem Biochip emittierten Chemilumineszenzstrahlung;

[0042] Fig. 2 einen Teilschnitt der Anordnung von Flächensensor und Biochip der Vorrichtung der Fig. 1;

[0043] Fig. 3 einen Teilschnitt einer alternativen Anordnung von Flächensensor und Biochip zur Detektion von Chemilumineszenzstrahlung;

[0044] Fig. 4 eine alternative Anordnung von Biochip und Flächensensor zur Detektion von Fluoreszenzstrahlung;

[0045] Fig. 5a eine CCD-Kontaktbelichtungsaufnahme der von einem Biochip emittierten Chemilumineszenzstrahlung;

[0046] Fig. 5b den Intensitätsverlauf des Chemilumineszenzsignals entlang einer Linie in Fig. 5a;

[0047] Fig. 6a eine mit einem Röntgenfilm gewonnene Aufnahme des Biochips der Fig. 5a;

[0048] Fig. 6b den Intensitätsverlauf entlang einer Linie in Fig. 6a;

[0049] Fig. 7 eine CCD-Kontaktbelichtungsaufnahme der von einem Protein-Chip emittierten Chemilumineszenzstrahlung;

[0050] Fig. 8 eine CCD-Kontaktbelichtungsaufnahme der von einem DNA-Chip emittierten Chemilumineszenzstrahlung;

[0051] Fig. 9 ein Diagramm, das die Intensität des Chemilumineszenzsignals in Abhängigkeit von der immobilisierten Oligonukleotidkonzentration wiedergibt;

[0052] Fig. 10 ein Diagramm, das zeigt, wie bei dem erfindungsgemäßen Verfahren der Meßbereich durch unterschiedliche Belichtungszeiten vergrößert werden kann;

[0053] Fig. 11 eine CCD-Kontaktbelichtungsaufnahme der von einem weiteren DNA-Chip emittierten Chemilumineszenzstrahlung;

[0054] Fig. 12 eine Diagramm, das eine aus der Aufnahme der Fig. 11 ermittelte Diskriminierungsrate veranschaulicht;

[0055] Fig. 13 eine CCD-Kontaktbelichtungsaufnahme eines diagnostischer Biochips zur Mutationsbestimmung in Onkogenen.

[0056] In Fig. 1 ist schematisch eine Explosionsdarstellung eines Detektionssystems 10 zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens dargestellt. Im dargestellten Beispiel dient das Detektionssystem 10 zur ortsaufgelösten Messung von Chemilumineszenzstrahlung. Die Chemilumineszenzstrahlung wird von Substanzen emittiert, die auf der planaren Oberfläche 11 eines funktionalisierten Bereichs 12 eines Biochips 13 immobilisiert sind. Dazu wird der Biochip 13 in möglichst geringem Abstand von einem Flächensensor 14, beispielsweise einem CCD-Chip, angeordnet (vergl. Fig. 2). Der Flächensensor 14 kann dann ohne Zwischen- 25 schaltung eines abbildenden optischen Systems, wie beispielsweise einer Linsen- oder einer Faseroptik, ein ortsaufgelöstes zweidimensionales Abbild der von der Oberfläche des funktionalisierten Bereichs 12 emittierten Chemilumineszenzstrahlung detektieren. In dem in Fig. 1 dargestellten Beispiel liegt der Biochip 13 auf einer den Flächensensor 14 30 umgebende Dichtung 15. Die Dichtung 15 besitzt eine Höhe, die so gewählt ist, daß bei aufgelegtem Biochip zwischen der Oberfläche 11 des funktionalisierten Bereichs 12 und dem Flächensensor 14 ein Reaktionsraum 16 ausgespart bleibt, der beispielsweise vor Auflegen des Biochips 13 mit einer in der Regel wässrigen Lösung eines Chemilumineszenzsubstrates gefüllt werden kann. Die gesamte Anordnung aus Biochip und Flächensensor ist von einem Gehäuse 17 35 umgeben, welches durch einen Deckel 18 lichtdicht verschlossen werden kann. Nach Auflegen des Biochips 13 wird Chemilumineszenzsubstrat von im funktionalisierten Bereich 12 immobilisierten Enzymen umgesetzt, was mit einer Lichtemission verbunden ist. Der Abstand zwischen der Oberfläche des Biochips 13 und dem Flächensensor 14 ist so gewählt, daß jedes Pixelelement des Sensors 14 im wesentlichen nur Licht aus unmittelbar gegenüberliegenden Bereichen des Biochips empfängt. Der Abstand zwischen Flächensensor und Biochip sollte daher nicht wesentlich größer als die Kantenlänge eines Pixels des Flächensensors 14 sein.

40 Typischerweise liegt dieser Abstand dann im Bereich von 5-100 µm. Als Obergrenze des Abstandes ist jedenfalls der Durchmesser der einzelnen Feldelemente auf dem Biochip 13 anzusehen, da diese Feldelemente noch eindeutig voneinander unterschieden werden müssen.

[0057] Bei einer besonders einfache Ausführungsform der Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die Substratlösung manuell in den Reaktionsraum 16 gefüllt werden. Bei einer automatisierten Anordnung können dazu beispielsweise auch Pipettierroboter verwendet werden. Es ist jedoch auch möglich, den Reaktionsraum 16 mit Hilfe von einer oder mehreren Leitungen 19, 20 zu befüllen bzw. zu spülen. Prinzipiell können folgende Automatisierungsschritte einzeln oder in Kombination reali- 45 siert werden:

siert werden: Einlegen bzw. Wechseln der Biochips 13, Zugabe von Substratlösung, sowie nach der Messung Waschen und Trocknen des Sensors 14. Der Flächensor kann in eine Flüsszelle, insbesondere in ein automatisches oder manuelles Fließinjektionssystem (FIA-System) als Teil einer Durchflüsszelle, integriert sein. Dabei können Flächensor und Biochip mittels Abstandshalter die Flüsszelle definieren. [0058] Das von dem Flächensor 14 detektierte Chemilumineszenzlicht der einzelnen Pixellemente wird mittels einer Steuerelektronik 21 digitalisiert und über eine Datenleitung 22 zu einem Computer 23 übertragen, der auch die Steuerung der Bildaufzeichnung, die Bildverarbeitung und Speicherung der Daten übernimmt. In einer speziellen Ausführungsform ist der Computer direkt in das System integriert.

[0059] In Fig. 2 ist die Anordnung der Fig. 1 im Teilschnitt in einem größeren Maßstab dargestellt. Die dargestellten Elemente sind mit denselben Bezugsziffern wie in Fig. 1 bezeichnet.

[0060] Fig. 3 zeigt eine Variante einer Meßanordnung zur Detektion von Chemilumineszenzstrahlung, bei welcher der Biochip aus einer dünnen Folie 24 besteht, die direkt auf dem Flächensor 14 liegt. Die Folie 24 weist beispielsweise nur eine Dicke von 10 µm auf und ist für das Chemilumineszenzlicht durchlässig. Diese Variante besitzt den Vorteil, daß die Dicke des Reaktionsraums 16 beliebig gewählt werden kann, da dieser sich auf der vom Sensor 14 abgewandten Seite der Folie 24 befindet und daher keinen Einfluß auf das Auflösungsvermögen des Detektionssystems hat.

[0061] In Fig. 4 ist eine Meßanordnung zur Detektion von Fluoreszenzlicht dargestellt. Der funktionalisierte Bereich 12 befindet sich auf einem für Anregungslicht transparenten Biochip 25. Beispielsweise mittels zweier an gegenüberliegenden Seitenkanten des Trägers aufgeklebter Prismen 26, 27 wird Anregungslicht (in Fig. 4 als gestrichelte Linie angedeutet) in den Biochip 25 eingekoppelt. Ein evaneszenter Anteil des Anregungslichts regt die auf der Oberfläche 11 des funktionalisierten Bereichs 12 fixierten fluoreszenzmarkierten Substanzen zur Emission von Fluoreszenzlicht an, das dann von dem Flächensor 14 registriert wird. Besteht das Anregungslicht und folglich auch das emittierte Fluoreszenzlicht aus kurzen Lichtimpulsen, kann eine nachgeschaltete Elektronik das vom Flächensor 14 registrierte Signal in einen möglicherweise vorhandenen Streulichtanteil und einen eigentlich interessierenden, zeitlich etwas verzögert emittierten Fluoreszenzanteil trennen. Eine zwischen Biochip und Flächensor angeordnete Filtereinrichtung zur Ausblendung des Streulichtanteils ist daher nicht erforderlich.

Beispiele

[0062] Die folgenden Beispiele wurden mit einem einfachen Aufbau für eine manuelle Bedienung, wie er in Fig. 1 schematisch dargestellt ist, durchgeführt. Es wird ein Interline-Flächensor mit Videofrequenz verwendet (Sony, 768 x 576 Pixel). Derartige CCD-Sensoren sind kommerziell nur gekapselt erhältlich, d. h. der Sensor ist in ein Gehäuse aus Keramik integriert und nach oben mit einer transparenten Abdeckung aus Glas verschlossen. Der Flächensor wurde durch Entfernen der Abdeckung freigelegt, so daß ein für eine scharfe Abbildung erforderlicher geringer Abstand zwischen Sensor und Biochip realisiert werden kann. Nach Freilegen des Sensors wurde die Elektronik durch Abdichten mit einer Vergußmasse geschützt, um Kurzschlüsse bei der Zugabe der wäßrigen Substratlösung zu verhindern.

[0063] Zugabe der Substratlösung, Einlegen des Biochips, sowie nach der Messung Waschen mit Wasser und Trocknen des CCD-Sensors wurden von Hand durchgeführt. Zum Schutz des CCD-Sensors kann auf diesem eine dünne Folie (z. B. mit einer Dicke von 3 µm) oder eine dünne Schutzschicht (z. B. Lackschicht) aufgebracht werden. Die auf einem CCD-Chip normalerweise vorhandene dünne SiO₂-Schicht reicht aber zum Schutz vor der wäßrigen Substratlösung aus.

[0064] Die Ausleseelektronik ist in einem Kameramodul untergebracht. Das Videosignal wird von einem 8 Bit Frame-Grabber eines Computers digitalisiert. Durch die Steuerung der On-Chip Integration wird eine beträchtliche Empfindlichkeitssteigerung erreicht. Außerdem läßt sich durch unterschiedliche Belichtungszeiten der dynamische Bereich des Systems erweitern. Die digitalisierten Bilddaten lassen sich direkt in einem gängigen Grafikformat abspeichern und stehen für eine weitere Bearbeitung unmittelbar zur Verfügung.

[0065] Steuerung und Bilderfassung kann direkt in einem Speicherchip des Detektionssystems oder extern über einen PC oder Laptop erfolgen.

Beispiel 1

Optische Auflösung

[0066] Fig. 5a zeigt als Beispiel für das räumliche Auflösungsvermögen des CCD-Sensors die Aufnahme eines Biochips. Als Träger dienten Glasoberflächen, auf die ein Array mit 5 x 5 Feldelementen aus einer dünnen Goldschicht sehr präzise aufgebracht wurde. Es handelte sich um mikrostrukturierte quadratische Goldoberflächen mit einer Seitenlänge von 100 µm und einem Mittenabstand (Raster) von 200 µm. Die Goldoberflächen wurden durch Behandlung mit einer HPDP-Biotinlösung (Pierce) biotinyliert. Um die gesamte Oberfläche mit SH-Gruppen abzusättigen, wurden die Chips in einem zweiten Schritt mit Mercaptohexanol behandelt. An das immobilisierte Biotin konnte nun ein mit Meerrettichperoxidase (POD) markiertes Streptavidin (Streptavidin-POD, Sigma, Stammlösung 1 mg/mL; Verdünnung 1 : 10 000) binden. Nach einem Waschschritt und Inkubation mit Chemilumineszenzsubstrat (SuperSignal Femto, ELISA, Chemilumineszenzsubstrat, Pierce) wurde der Chip vermessen. Bei der Aufnahme der Fig. 5a wurde eine Belichtungszeit von 12 s eingestellt. Ein Teilbild der Fig. 5a zeigt zwei Feldelemente in vergrößerter Darstellung, so daß bereits die einzelnen Pixel des CCD-Sensors sichtbar werden. In Fig. 5b ist der Verlauf des Chemilumineszenzsignals entlang der Linie "5b" der Fig. 5a dargestellt. Für Vergleichsmessungen wurde der Biochip mit einem Röntgenfilm (Medical X-Ray Film, Fuji RX, No. 036010) durch Kontaktbelichtung vermessen. In Abb. 6a ist das mit dem Röntgenfilm bei einer Belichtungszeit von ebenfalls 12 s erzielte Ergebnis dargestellt. Fig. 6b zeigt die Schwärzungskurve des Films entlang der Linie "6b" der Fig. 6a. Insbesondere aus dem Vergleich der Fig. 5b und 6b wird deutlich, daß mit dem erfindungsgemäßen Maßaufbau Setup 100 µm Strukturen gut aufgelöst werden können und die erhaltene Auflösung, sowie das Signal/Rausch-Verhältnis besser sind als mit dem verwendeten Standardröntgenfilm. Die Empfindlichkeit des CCD-Chips entsprach in diesem Format der des Röntgenfilms.

Beispiel 2

Protein-Chip

[0067] Die Oberfläche eines Glasobjektträgers wurde mit Trimethylchlorsilan silanisiert. Auf dieser Oberfläche wurde ein Anti-Peroxidaseantikörper (Anti-Peroxidaseantikörper, rabbit, Sigma) in einzelnen Spots und unterschiedlichen Konzentrationen adsorptiv immobilisiert. Nach einer Inkubationszeit von 3 h wurde die Oberfläche mit einer Mischung aus BSA und Casein geblockt. Die Chips wurden nun 30–60 min mit unterschiedlichen Konzentrationen an Peroxidase (Peroxidase aus Meerrettich, Grade I, Boehringer, Stammlösung 5 mg/mL) inkubiert, gewaschen, mit Chemilumineszenzsubstrat versetzt und mit dem Detektionssystem (CCD-Chip, 3 µm Folie, 1,5 µL Substrallösung, Biochip aufgelegt) vermessen. Das Ergebnis der Messung ist in Fig. 7 dargestellt. Man erkennt einen Protein-Chip mit manuell aufgebrachten Spots mit 3 verschiedenen Anti-POD-Antikörperkonzentrationen (Spalten von links nach rechts: Verdünnung 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10 000; POD-Verdünnung 1 : 10⁶; Belichtungszeit 35 s). Bei diesem Testformat war die Empfindlichkeit um eine Größenordnung höher als unter identischen Bedingungen mit dem Röntgenfilm.

Beispiel 3

DNA-Chip

[0068] Auf Kunststoffträgern wurden 18-mer Oligonukleotide kovalent immobilisiert (Sequenz: 5'TATT-CAGGCTGGGGCTG-3'). Es wurde mit einer komplementären 18-mer Sonde, die am 5'-Ende biotinyliert war, hybridisiert (5 × SSP, 0,1% Tween, 1 h). Nach einem Waschschritt wurde mit Streptavidin-POD inkubiert (Verdünnung 1 : 100; 5 × SSP, 0,1% Tween 20; 30 min) und nach Waschen mit dem bereits im Beispiel 2 beschriebenen Aufbau vermessen. Fig. 8 zeigt eine Übersicht eines homogenen in einem Array aus 5 × 5 Feldelementen gespotteten Biochips. Es ist auch möglich das Streptavidin-POD bereits der Hybridisierungslösung zuzusetzen. Auf diese Weise wird die Zahl der Inkubations- und Waschschritte reduziert und der Test ist in Durchführbarkeit und Schnelligkeit (bis auf die Substratzugabe) mit Fluoreszenzsystemen vergleichbar.

[0069] Die Nachweisgrenze für die Detektion von DNA wurde bestimmt, indem DNA-Chips nach oben beschriebenem Schema mit ansteigenden Konzentrationen an Biotin-sonde hybridisiert wurden. Das Ergebnis ist in Fig. 9 dargestellt. Die Nachweisgrenze liegt in diesem Format (Belichtungszeit 15) bei einer Absolutmenge an DNA von unter 10⁻¹⁶ mol und wird durch den Hintergrund, d. h. die unspezifische Bindung von Streptavidin-POD an die immobilisierten Oligonukleotide limitiert.

[0070] Der dynamische Bereich des hier verwendeten Video-CCD-Chips von 8 Bit kann durch unterschiedliche Belichtungszeiten ausgeglichen werden. Die Ergebnisse entsprechender experimenteller Untersuchungen sind im Diagramm der Fig. 10 dargestellt. Auf diese Weise ist eine Erweiterung des Meßbereiches auf 10 Bit und darüber möglich.

[0071] Wie bei anderen Detektionsmethoden ist durch die Wahl von stringenten Bedingungen (20 min Waschen mit 0,3 × SSP und 25% Formamid nach der Hybridisierung) eine gute Diskriminierung zwischen Perfect-Match (PM) und einfachen Mismatch (mm) Proben möglich. Für die oben erwähnten immobilisierten 18-mer Oligonukleotide werden bei Einführung eines CC-Mismatches an Position 7 Diskriminierungsraten von über 10 erreicht. In Fig. 11 ist die entsprechende CCD-Kontaktbelichtungsaufnahme des

resultierenden Chemilumineszenzsignals eines DNA-Chips dargestellt (Spots der linken Spalte: Perfect-Match (PM); Spots der rechten Spalte Mismatch (MM). Die Signalintensitäten sind im Diagramm der Fig. 12 dargestellt. Das Intensitätsverhältnis von PM/MM beträgt im dargestellten Beispiel 10,9.

Beispiel 4

Diagnostischer Biochip – Mutationsbestimmung in Onkogenen

[0072] Es wurde ein DNA-Chip mit verschiedenen 13mer Capture-Probes (immobilisierte Sonden) für 10 Mutationen eines Onkogens hergestellt. Zusätzlich wurde eine Sonde für den Wildtyp und eine PCR-Kontrolle integriert. Aus einer Zelllinie wurde DNA mit der Mutation 3 (siehe Tabelle unten) isoliert und mittels mutationsreicher PCR amplifiziert (50 µL Ansatz mit ca. 10 ng DNA; 35 Zyklen; Primer an 5'-Ende biotinyliert; Amplifikationslänge ca. 157 Basenpaare). Das PCR-Produkt wurde mit 20 × SSP auf 6 × SSP eingestellt und mit 6 × SSP 1 : 10 verdünnt. Vor der Hybridisierung wurde 1 : 1 mit einer 1 : 100-Verdünnung von Streptavidin-POD in 6 × SSP versetzt. Nach der Hybridisierung wurde mit 6 × SSP gewaschen, der Chip mit Chemilumineszenzsubstrat versetzt und im Detektor vermessen. Die Zuordnung der jeweiligen Mutante (Diskriminierungsraten von über 20 zu anderen Mutanten) ist eindeutig möglich. In Fig. 13 ist das Ergebnis der entsprechende Chemilumineszenzmessung dargestellt (Biochip nach stringenter Hybridisierung (1 h, 37°C 6 × SSP); 3 s Belichtung).

[0073] Es wurden folgende Diskriminierungsraten gemessen:

| Capture Probe | Diskriminierung zur Mutante 3 |
|---------------|-------------------------------|
| PCR-Kontrolle | 1.11 |
| Mutante 3 | 1.00 |
| Mutante 1 | 21.5 |
| Mutante 5 | 64.4 |
| Mutante 6 | 71.1 |
| Wildtyp | 10.5 |

[0074] Für alle anderen Mutationen liegt die Diskriminierung bei > 70.

Patentansprüche

1. Verwendung eines bildgebenden photoelektrischen Flächensensors zur Kontaktabbildung einer Oberfläche eines Biochips.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Flächensensor ein Diodenarray, ein CCD-Sensor oder ein TFA-Bildsensor ist.
3. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Flächensensor in einer Meßzelle integriert ist.
4. Verwendung gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßzelle als Durchflußzelle ausgebildet ist.
5. Verfahren zur ortsaufgelösten Detektion von elektromagnetischer Strahlung, die von auf einer Oberfläche eines Trägers immobilisierten Substanzen emittiert wird, wobei man einen bildgebenden photoelektrischen Flächensensor in geringem Abstand von der Oberfläche des Trägers anordnet,

die immobilisierten Substanzen zur Emission von elektromagnetischer Strahlung anregt, und die emittierte Strahlung ohne Verwendung eines abbildenden optischen Systems photoelektrisch detektiert.

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man von den immobilisierten Substanzen emittierte Chemilumineszenzstrahlung detektiert.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Chemilumineszenzstrahlung durch enzymatische Reaktionen erzeugt.

8. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man von den immobilisierten Substanzen emittierte Biolumineszenzstrahlung detektiert.

9. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man von den immobilisierten Substanzen emittierte Fluoreszenzstrahlung detektiert.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Fluoreszenzstrahlung durch Einkoppeln von Licht in den Träger und Anregung der immobilisierten Substanzen mit evaneszentem Licht erzeugt.

11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 5 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man die Substanzen auf dem photoelektrischen Flächensensor immobilisiert.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

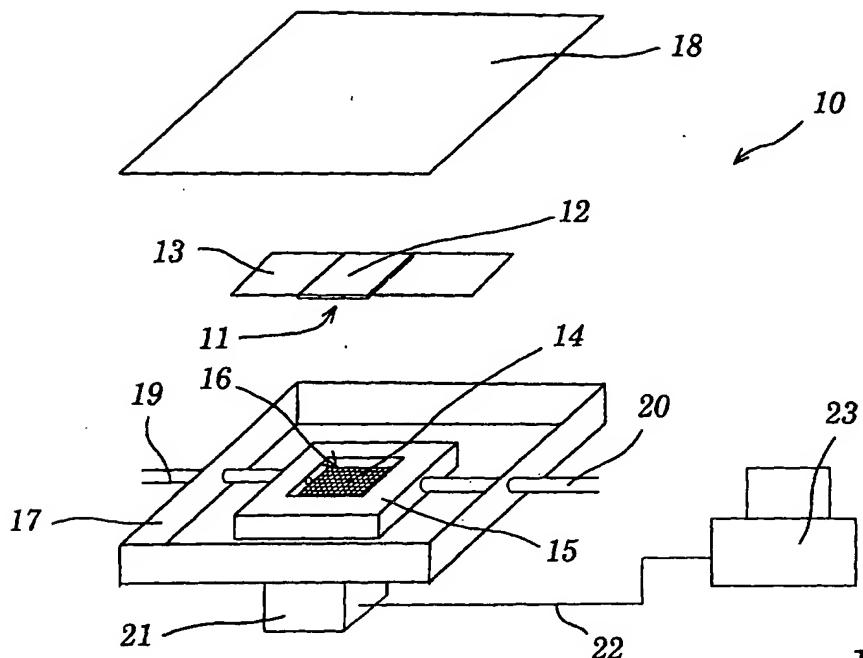


Fig. 1

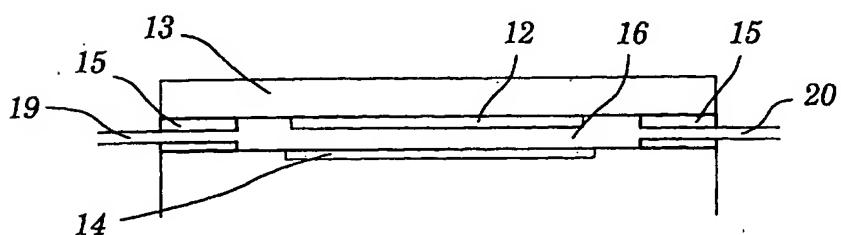


Fig. 2

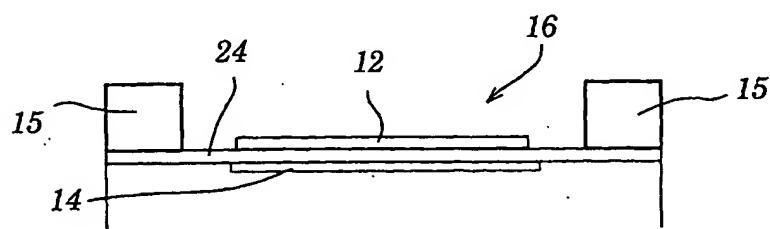


Fig. 3

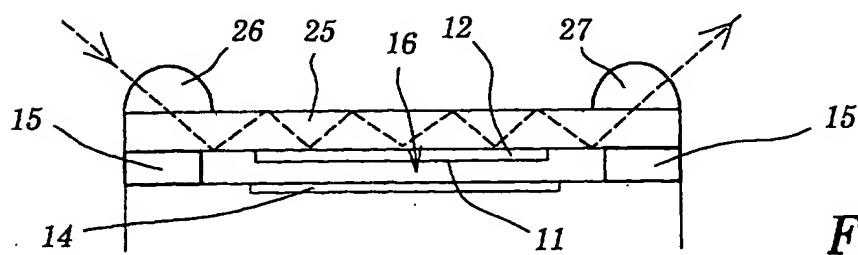


Fig. 4

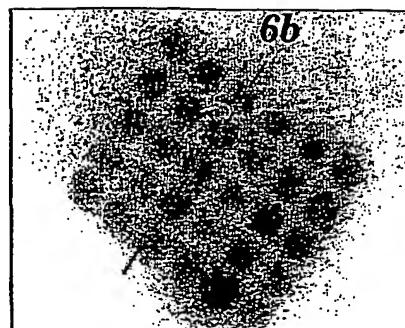
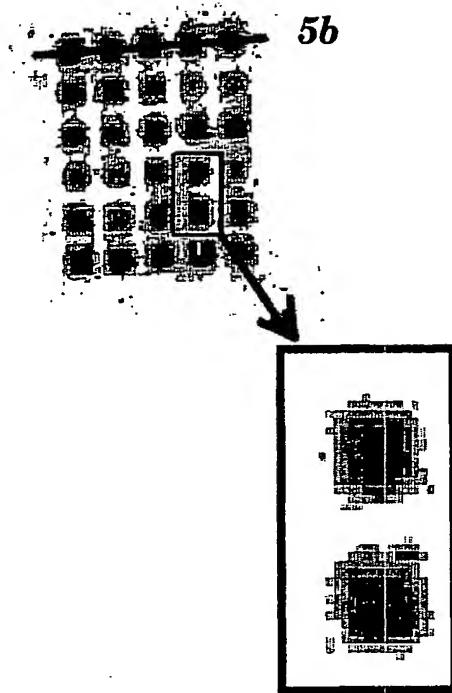


Fig. 5a

Fig. 6a

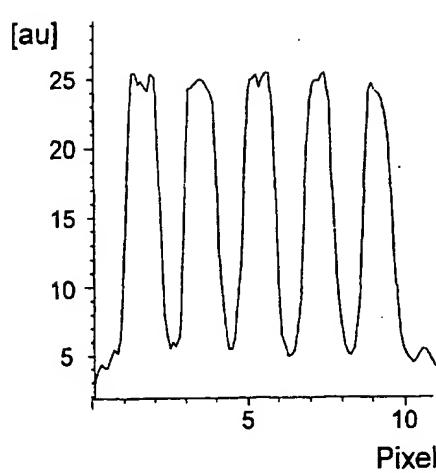


Fig. 5b

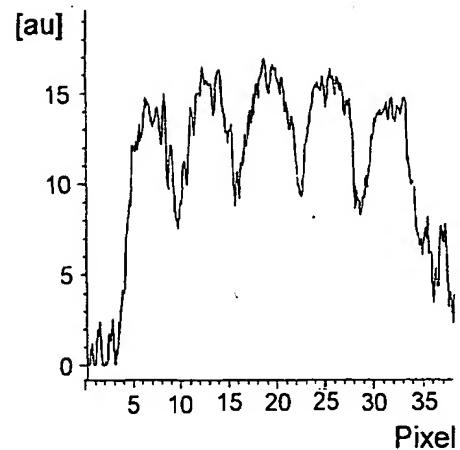


Fig. 6b

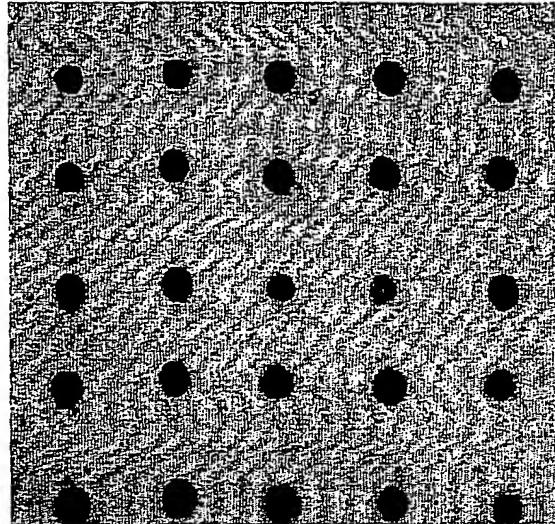
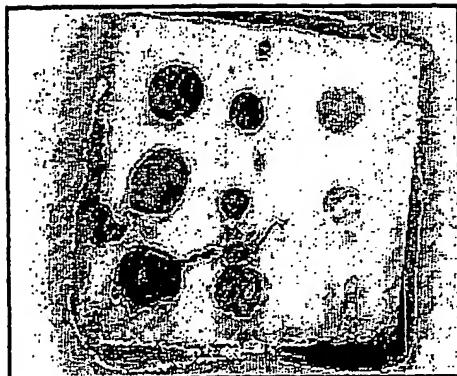


Fig. 7

Fig. 8

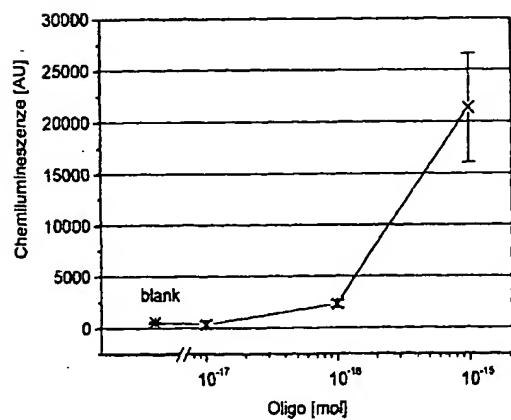


Fig. 9

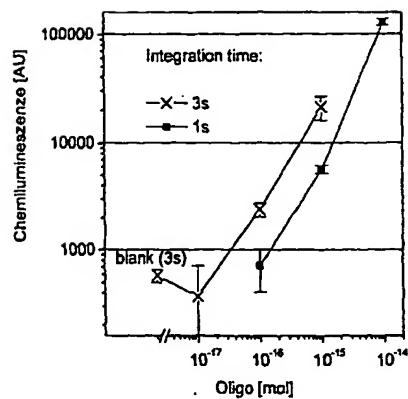


Fig. 10

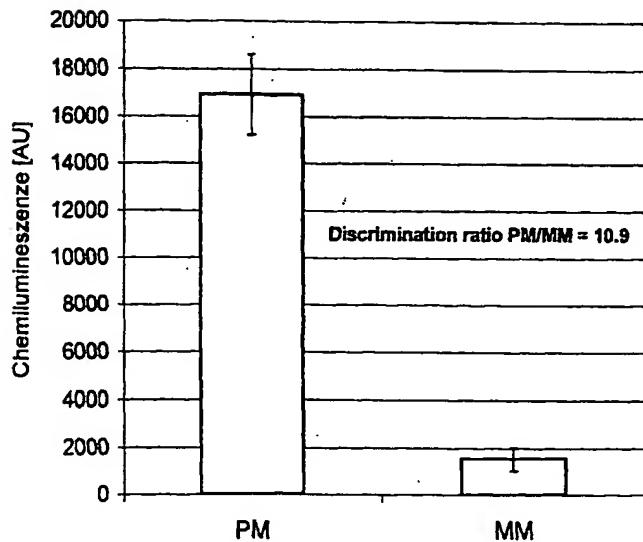
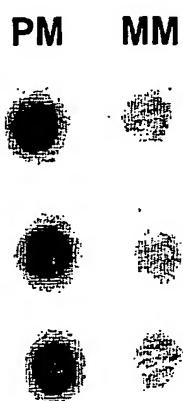


Fig. 11

Fig. 12

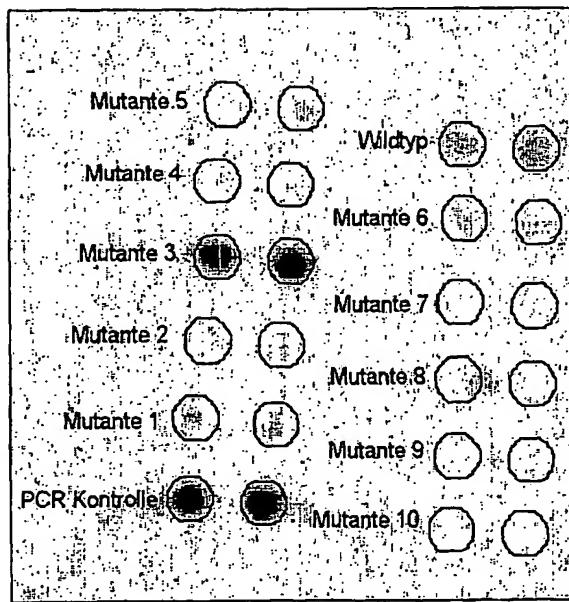


Fig. 13